

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-71750

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>

A 61 L 27/00  
A 61 K 37/04  
37/12

識別記号

ADA  
AGZ

庁内整理番号

V 6971-4C  
8615-4C  
8615-4C

⑬ 公開 平成2年(1990)3月12日

審査請求 有 請求項の数 46 (全13頁)

⑭ 発明の名称 ファイブリン-コラーゲン組織相当物、その製造方法及び使用方法

⑰ 特 願 平1-140946

⑱ 出 願 平1(1989)6月2日

優先権主張 ⑲1988年6月2日⑳米国(US)㉑201585

⑳ 発 明 者 クリスピン・ビー・ウ エインバーク アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02146、ブルックリン、ステッドマン・ストリート・6

㉒ 出 願 人 オーガノジェネシス・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02142、ケンブリッジ、ロジャース・ストリート・83

㉔ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

ファイブリン-コラーゲン組織相当物、その製造方法及び使用方法

2. 特許請求の範囲

(1)(i) 収縮物質で収縮させた水和コラーゲン格子と

(ii) フィブリンとからなる組織相当物。

(2) フィブリンとコラーゲンが架橋結合している請求項1の組織相当物。

(3) コラーゲン及びフィブリンがそれぞれ約3～30mg/mlの濃度である請求項1の組織相当物。

(4) コラーゲンが約10～約15mg/mlの濃度であり、フィブリンが約15～約25mg/mlの濃度である請求項1の組織相当物。

(5) 収縮物質が水和コラーゲン格子を収縮させる細胞型からなる請求項1の組織相当物。

(6) 収縮物質が繊維芽細胞、平滑筋細胞、横紋筋細胞、心筋細胞又は血小板からなる請求項1の組織相当物。

(7) 格子が更に表皮ケラチン細胞又は脱塩した骨粉を含む請求項1の組織相当物。

(8) 組織相当物が皮膚、骨、血管、臓器又は膜の組織相当物である請求項1の組織相当物。

(9) 更に少なくとも1種のプロテアーゼ阻害剤を含む請求項1の組織相当物。

(10) 1つ以上の層が(i)収縮物質で収縮させた水和コラーゲン格子と(ii)フィブリンとからなる、少なくとも2層を有する組織相当物。

(11)(a) コラーゲン、フィブリンノーゲン、フィブリンノーゲンからフィブリンを形成させる物質及び収縮物質がゲル混合物中に分散しているゲルを形成する条件下で、コラーゲン、フィブリンノーゲン、フィブリンノーゲンからフィブリンを形成させる物質

及び少なくとも1種の収縮物質からなる混合物を形成し、そして

(b) ゲルが収縮して組織相当物が形成され得る条件下に、ステップ(a)で製造したゲルを維持することからなる組織相当物の製造方法。

(12) フィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質がトロンビンからなる請求項11の方法。

(13) 混合物が、フィブリンとコラーゲンを架橋結合させる物質を含むか又は該物質に曝されている請求項11の方法。

(14) 架橋結合剤が第XII因子である請求項13の方法。

(15) 組織相当物中又は組織相当物上に生細胞を加えることを更に含む請求項11の方法。

(16) コラーゲン及びフィブリノーゲンがそれぞれ約0.3〜約3.0 mg/mlの濃度である請求項11の方法。

る物質とフィブリノーゲンとをステップ(b)の組織相当物の少なくとも1つの表面に適用することからなる組織相当物の製造方法。

(22) フィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質がトロンビンからなる請求項21の方法。

(23) 混合物が、フィブリンとコラーゲンを架橋結合させる物質を更に含むか又は前記物質に曝されている請求項21の方法。

(24) 架橋結合物質が第XII因子からなる請求項23の方法。

(25) 組織相当物中又は組織相当物上に生細胞を加えることを更に含む請求項21の方法。

(26) コラーゲン及びフィブリノーゲンがそれぞれ約0.3〜約3.0 mg/mlの濃度である請求項21の方法。

(27) コラーゲンが約1.0〜約1.5 mg/ml、フィブリノーゲンが約1.5〜約2.5 mg/mlの濃度であ

(17) コラーゲンが約1.0〜約1.5 mg/ml、フィブリノーゲンが約1.5〜約2.5 mg/mlの濃度である請求項11の方法。

(18) 請求項11の方法により形成した組織相当物。

(19) コラーゲン及びフィブリンのそれぞれが約3〜約30 mg/mlの濃度である請求項18の組織相当物。

(20) コラーゲンが約10〜約15 mg/ml、フィブリンが約15〜約25 mg/mlの濃度である請求項18の組織相当物。

(21)(a) コラーゲンと収縮物質とがその中に分散しているゲルを形成する条件下で、コラーゲンと少なくとも1種の収縮物質からなる混合物を形成し、

(b) ステップ(a)で得たゲルを、ゲルが収縮して組織相当物が形成され得る条件に維持し、そして  
(c) フィブリノーゲンからフィブリンを形成させ

る請求項21の方法。

(28) 請求項21の方法に従って形成した組織相当物。

(29) コラーゲン及びフィブリンがそれぞれ約3.0〜約30.0 mg/mlの濃度である請求項28の組織相当物。

(30) コラーゲンが約10.0〜約15.0 mg/ml、フィブリンが約15.0〜約25.0 mg/mlの濃度である請求項28の組織相当物。

(31)(a) ゲル内にコラーゲンと収縮物質が分散しているゲルを形成する条件下で、コラーゲンと少なくとも1種の収縮物質からなる混合物を形成し、ゲルが収縮して第一の組織相当物が形成され得る条件下にゲルを維持し、

(b) 第一の組織相当物にフィブリノーゲンとトロンビンとからなる混合物を適用し、そして

(c) 上記ステップ(a)に従って製造した第二の組

組織相当物と第一の組織相当物とを接触させ、

(d) 組織相当物の層が更に所望のときにはステップ(b)及び(c)を繰り返す

ことからなる少なくとも2つの層を有する組織相当物の製造方法。

(32) ステップ(a)、ステップ(c)又はステップ(a)及びステップ(c)の混合物が更にフィブリノーゲン及びトロロンピンを含んでいる請求項31の方法。

(33) ステップ(c)の組織相当物の表面にフィブリノーゲンとトロロンピンとからなる混合物を適用する請求項31の方法。

(34)(a) ゲル内にコラーゲン、収縮物質、フィブリノーゲン及びフィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質が分散しているゲルを形成する条件下で、コラーゲン、少なくとも1種の収縮物質、フィブリノーゲン及びフィブリノーゲンから

せ、

(c) コラーゲンをゲルとし、フィブリノーゲン、フィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質及び収縮物質を含有する水和コラーゲン格子を形成させるのに十分なレベルにコラーゲン溶液のpH及び温度を上昇させ、そして

(d) 前記物質がフィブリノーゲンを開裂させてフィブリンを形成させ、収縮物質がコラーゲン格子を収縮させるに十分な条件下に、格子、フィブリノーゲン、フィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質及び収縮物質を維持して組織相当物を形成する

ことからなる組織相当物の製造方法。

(36) ステップ(b)と(c)を同時に実施する請求項35の方法。

(37) 混合物が更に、フィブリノーゲンとコラーゲンを架橋結合させる物質を含んでいる請求項35

フィブリンを形成させる物質とからなる混合物を形成し、ゲルが収縮して第一の組織相当物が形成されうる条件下にゲルを維持し、

(b) 第一の組織相当物に、フィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質とフィブリノーゲンとからなる混合物を適用し、そして

(c) 上記ステップ(a)に従って製造した第二の組織相当物と第一の組織相当物とを接触させ、そして

(d) 組織相当物の層が更に所望であれば、ステップ(b)及び(c)を繰り返す

ことからなる少なくとも2層を有する組織相当物の製造方法。

(35)(a) コラーゲンの酸性溶液を形成し、

(b) フィブリノーゲン、フィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質、少なくとも1種の収縮物質及び栄養培地をコラーゲンの酸性溶液と合

の方法。

(38) 前記物質が第XII因子である請求項36の方法。

(39) 組織相当物中又は組織相当物上に生細胞を加えることをさらに含む請求項35の方法。

(40) コラーゲン及びフィブリノーゲンがそれぞれ約0.3~約3.0 mg/mlの濃度である請求項35の方法。

(41) コラーゲンが約1.0~約1.5 mg/ml、フィブリノーゲンが約1.5~約2.5 mg/mlの濃度である請求項35の方法。

(42) 請求項35の方法で形成された組織相当物。

(43) コラーゲン及びフィブリンがそれぞれ約3~約30 mg/mlの濃度である請求項42の組織相当物。

(44) コラーゲンが約10~約15 mg/ml、フィブリンが約15~約25 mg/mlの濃度である請求項42の組織相当物。

(45) 請求項1の組織相当物中の裂け口を結合す

る方法であって、

(a) フィブリンノーゲンとフィブリンノーゲンからフィブリンを形成させる物質とからなる混合物を製け目に適用し、そして

(b) ステップ(a)の組織相当物を、フィブリンが形成されうる条件下に維持する

ことからなる前記方法。

(46)(a) フィブリンノーゲンとフィブリンノーゲンからフィブリンを形成させる物質とからなる混合物を組織相当物の組織部分に適用し、そして

(b) ステップ(a)の組織相当物を、フィブリンが形成されうる条件下に維持する

ことからなる、収縮物質で収縮させた水和コラーゲン格子、又は(i)収縮物質で収縮させた水和コラーゲン格子と(ii)フィブリンとからなる組織相当物の損傷を修復する方法。

骨、骨、血液、臓器、腺及び血管の相当物が含まれるがこれらに限定されるものではない。組織相当物は生細胞と細胞外のマトリックス分子、主としてコラーゲンからなり、適宜、正常な組織に典型的には見られない成分を有していてもよい。

このような組織相当物は、研究開発、組織及び臓器の移植並びに検査での使用を含め広範な用途を有している。

前記の組織相当物は長期間生存しえ、産生された単位が実質的に均一であることを確保しながら大量に製造することができる細胞で形成される。このような組織相当物中の細胞の構造的配置、合成量及び透過性(permeability)は正常組織細胞のものと類似している。これらの組織相当物は人因のものである必要はなく、所望のどんな動物のものであってよいことを理解すべきである。

ヒトの皮膚組織相当物は、十分分化しているヒ

### 3. 発明の詳細な説明

#### 発明の分野

本発明は、(i)収縮物質で収縮させた水和コラーゲン格子(hydrated collagen lattice)と(ii)フィブリンとからなる組織相当物(tissue equivalent)並びにこのような組織相当物の製法及び使用法に関する。本発明はまた、組織相当物の損傷を修復する方法にも係る。

組織相当物を形成するために繊維芽細胞又は血小板のような収縮物質で収縮させた水和コラーゲン格子から製造した組織相当物は、米国特許第4,485,096; 4,485,097; 4,539,716; 4,546,500; 4,604,346号明細書及び1987年3月31日出願した係属中の米国特許出願第32,848号に開示されており、これらは全て参考として本明細書に含むものとする(以下、全て「従来の特許」と記す)。これらの組織相当物には、上皮組織、結合組織、軟

トの正常な上皮細胞を増殖させて、現在の所通常の培養法では得られていない正常な皮膚角質層と完全な基底膜を生成することができる。このような皮膚相当物は動物実験での永久的皮膚移植では非常に多く使用されてきており、米国では最近臨床試験が行われている。このような皮膚組織相当物は形態学上正常であり、遺伝学的マーキングが示すように移植後も構成細胞は生存し、その機能も示されている。例えば、Science, 211:1052~1054 (1981); J. Invest. Dermatol. 81:2S~10S (1983)参照。

in vitroで製造した皮膚組織相当物は天然の皮膚と非常に類似しており、十分な構造を有する基底膜により真皮層と結合しているよく分化した基底細胞を有する多層の表皮からなる。真皮層は表皮繊維芽細胞が分布しているコラーゲンマトリックスからなる。三次元的なコラーゲンマトリッ

クス中の細胞は、多くの点で、in vivoで優勢なものと同等な分化状態を達成している。例えば、内在する繊維芽細胞は合成的に活性であり、in vitroでマトリックスのコラーゲンと多くの他の分子種の両者を増加させ、in vivoの細胞に典型的な透過性を示す。例えば、Collagen Rel. Res., 4: 351~364 (1984)参照。ヒト及びラットの繊維芽細胞の組織相当物格子収縮能に対するステロイドの作用が評価されている。J. Invest. Dermatol., 82:341~344 (1984)参照。乾癬症の研究のために、皮膚組織相当物モデルを使用して、乾癬細胞及び正常細胞を有する組織が作成されている (Science, 230: 669~672, 1985)。最近、表皮クラチン細胞に色素を与えるメラニン細胞を含有させることにより、皮膚組織相当物を着色できること、及び紫外線照射によって、in vitroでこの過程の速度が上昇することが示されている (J.

細胞から作られ、血管組織相当物の外膜を構成する。支持部材、例えば合成メッシュを、血管組織相当物の、典型的には中膜と外膜との間の壁に適宜含ませて血管組織相当物を強化することもできる。abluminal 表面に隣接したプラスチックのスリーブのような取りはずしのできる保護不透過膜を適宜有していてもよい。

このような血管組織相当物内の層は天然の血管で典型的に見られるものと逆の順序であってよいことが理解されるべきである。例えば、正常な血管の内膜を構成している内皮細胞と基底膜が管状の血管組織相当物の外膜になるようにすることができる。このような血管組織相当物の中膜は平滑筋細胞及びコラーゲン格子からなり、血管組織相当物の中膜を構成する。このような逆の順序になっている血管組織相当物の内層はコラーゲン格子内の外膜繊維芽細胞から作製したものであり、正

Invest. Dermatol., 87: 642~647, 1986)。

ヒト血管組織相当物は、典型的には細胞外マトリックス分子及び培養した血管細胞から構築された多層の管である。例えば、Science, 231: 397~400, 1986 ; 米国特許第4,539,716号及び第4,456,500号明細書参照。それらは構造と機能がヒトの血管に類似している。血管組織相当物はin vitroで基底膜を産生する一層の内皮細胞で裏打ちされていてよい。内皮細胞及び基底膜は共にこのような血管組織相当物の内膜を構成している。中間層はコラーゲン格子中の平滑筋細胞からなり、このような血管組織相当物の中膜を構成する。平滑筋細胞はマトリックスにコラーゲン、エラスチン及び他の分子を提供する。いくつかの実施態様では、特別な用途用にヒアルロン酸のような他の細胞外マトリックス成分を適宜添加する。血管組織相当物の外層はコラーゲン格子内の外膜繊維芽

常な血管では外膜を構成することになる層を形成している。

適切なソースから培養した細胞を使用することにより種々の型の血管用の血管組織相当物を製造することができる。例えば、動脈の血管組織相当物は動脈の対応する層から培養した細胞を更に含んでおり、毛細血管の血管組織相当物は外膜繊維芽細胞の代りに周皮細胞および毛細管の内皮細胞を更に含んでおり、そして静脈の血管組織相当物は静脈から培養した細胞を更に含んでおり、動脈の血管組織相当物より薄い外膜を使用して作製する。特定の疾患を研究するためには、特定の疾患の患者からの培養細胞を血管組織相当物に取り込ませる。

組織相当物は所望のどんな形にも成形できる。皮膚組織相当物は一般に平坦なシートとして成形し、血管相当物は一般に中空管又は網目状の中空

管として製造する。しかし、組織相当物の天然の形状又は配置を変えることが望ましいこともある。例えば、皮膚組織相当物をシートではなく円筒状に成形することもでき、血管組織相当物の層を上記のように天然の血管の順序とは逆にすることができる。

前述の組織相当物の使用において、用途によっては、コラーゲン格子自体を、そして組織相当物が層からなるときには層自体の結合を強化することが望ましいことが発見された。広範囲の縫合及び切開のように、組織相当物のかなりの機械的操作を含む用途では、コラーゲン格子を強化することが特に望ましい。例えば、血管組織相当物は多層のコラーゲン格子からなるものであるが、圧力、切開又は縫合のような機械的ストレス下でこれらの層が層間に剥離する場合があることが発見されている。更に、血管組織相当物は、ある用途では

ある。

コラーゲン格子の形成中又は形成後のいずれかにフィブリンをコラーゲン格子に取り込ませるか又は添加することができる。本発明のある実施態様では、形成中の層もしくは形成した層内又はその両者にフィブリンを取り込ませることができる。更に、多層のコラーゲン又はフィブリン-コラーゲンの組織相当物の多層間の接着は、接着すべき1つ以上の層の表面にフィブリノーゲン及びトロンピンを適用することにより改善できる。

本発明の組織相当物のフィブリン及びコラーゲンの濃度はそれぞれ約3〜約30mg/mlであるが、フィブリンが約15〜約25mg/ml及びコラーゲンが約10〜約15mg/mlの濃度であるのがより好ましい。コラーゲン又はフィブリン-コラーゲン組織相当物の表面にフィブリノーゲン及びトロンピンを適用する実施態様では、フィブリン濃度は、典型的

人工血管として使用される場所で切ったり縫ったりされるので、(受容者の血管からクランプを除去した直後)直ちに血管内圧力に耐えなければならず、また血管組織相当物は、例えば生きている皮膚の相当物が有しているような *in vivo* で強化される機会是有していないのである。

従って、ある種の用途では、このような組織相当物の強化法が望まれる。

#### 発明の概要

本発明は、(i) 収縮物質で収縮させた水和コラーゲン格子及び(ii)フィブリンからなる組織相当物並びにこのような組織相当物の製法を開示している。本発明は、組織相当物の損傷を修復する方法も開示している。本発明の組織相当物は、強度がより強いこと、そして多層の組織相当物の場合には強度と層間の接着の両方がより強いという点で、従来の特許に開示されているものより有利で

にはフィブリノーゲン及びトロンピンを適用した表面又は表面付近で最も高い値となる勾配を示すであろう。

本発明に使用する好ましい収縮物質には繊維芽細胞、平滑筋細胞、横紋筋細胞、心筋細胞及び血小板がある。

本発明の組織相当物は、その強度及び安定性を更に増すために、フィブリンとコラーゲンを架橋結合させうる物質、例えば第XII因子を更に含んでいてもよい。その他の任意の添加剤としては、フィブリン-コラーゲン格子を分解から守る薬剤、例えばプロテアーゼ阻害剤がある。

本発明のフィブリン-コラーゲン組織相当物は、表皮ケラチン細胞(keratinocyte)もしくは他の上皮細胞又は他の組織細胞のような生細胞及び脱塩した骨粉グリコソアミノグリカン、例えばヒアルロン酸、他の結合組織蛋白質例えばフィブロネ

クチン又はエラスチン及び他の因子、例えば成長因子又は臓器形成因子のような他の添加物質を含み有していてもよい。

本発明方法は、(i) フィブリン-コラーゲン組織相当物の製法、(ii) 多層のコラーゲン又はフィブリン-コラーゲン組織相当物の層間の接着の改善法、及び (iii) 組織相当物の損傷、例えば裂け目の修復法を含んでいる。

フィブリン-コラーゲン組織相当物を形成する本発明の1つの方法は、

(a) ゲル混合物中にコラーゲン、フィブリノーゲン、フィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質及び収縮物質が分散しているゲルを形成する条件下で、コラーゲン、フィブリノーゲン、フィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質及び少なくとも1種の収縮物質からなる混合物を形成し、そして

の表面に、フィブリノーゲンとフィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質とを適用することからなる。

フィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質はトロンビンからなるのが好ましい。ステップ(c) では、フィブリノーゲンとトロンビンを溶液として適用すると好適である。このような実施態様では、フィブリノーゲン溶液は典型的には約5 mg/ml〜約25 mg/ml、そしてトロンビン溶液は約25〜約500 単位/mlの濃度である。組織相当物の表面にフィブリノーゲン及びトロンビンを適用する方法は、多層のコラーゲン又はフィブリン-コラーゲン組織相当物の層間の接着を強化するためにも使用できる。

本発明は少なくとも2層を有する組織相当物の製法も提供する。この方法は、

(a) ゲル内にコラーゲン、収縮物質、フィブリ

(b) ステップ(a) で製造したゲルを、ゲルが収縮して組織相当物が形成される条件下に維持することからなる。

このような混合物中のコラーゲン及びフィブリノーゲン濃度はそれぞれ約 0.3〜約3.0 mg/mlである。より好ましくは、コラーゲンは約 1.0〜1.5 mg/ml、フィブリノーゲンは約 1.5〜約2.5 mg/ml、そしてトロンビンが約 0.1〜約10単位(unit)/mlの濃度である。

フィブリン-コラーゲン組織相当物を製造する本発明のもう1つの方法は、

(a) コラーゲン及び収縮剤が分散しているゲルを形成する条件下で、コラーゲンと少なくとも1種の収縮剤からなる混合物を形成し、  
(b) ステップ(a) で得たゲルを、ゲルが収縮して組織相当物が形成される条件下に維持し、そして  
(c) ステップ(b) の組織相当物の少なくとも1つ

コラーゲン及びフィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質が分散しているゲルを形成する条件下で、コラーゲン、少なくとも1種の収縮物質、フィブリノーゲン及びフィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質とからなる混合物を形成し、ゲルが収縮して第一の組織相当物が形成される条件下にゲルを維持し、

(b) 第一の組織相当物に、フィブリノーゲンとフィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質とからなる混合物を適用し、

(c) 上記ステップ(a) に従って製造した第二の組織相当物を第一の組織相当物と接触させ、そして  
(d) 組織相当物の層が更に所望の場合には、ステップ(b) 及び(c) を繰り返す

ことからなる。

本発明は、収縮物質で収縮させた水和コラーゲン又は(i) 収縮物質で収縮させた水和コラーゲン



及び(ii)フィブリンからなる組織相当物の損傷の修復、例えば裂け目を接合する方法も提供する。この方法は、

- (a) 組織相当物の損傷部分に、フィブリンノーゲンとフィブリノーゲンからフィブリンを形成させる物質とからなる混合物を適用し、そして
- (b) ステップ(a)の組織相当物を、フィブリンが形成されうる条件下に維持することからなる。

#### 発明の詳細な説明

組織相当物を形成するために収縮物質で収縮させた水和コラーゲン格子から製造した組織相当物は従来の特許に開示されている。予用されていなかったが、このような組織相当物のコラーゲン格子内にフィブリンを取り込ませることにより改善された特性を有する組織相当物が製造されることを発見した。従って、本発明の組織相当物は製法及び使用法は従来の特許に開示されているものと

くは約3.5のコラーゲンの酸性溶液と、フィブリノーゲンとトロンビンの溶液と、繊維芽細胞を含む栄養培地とを迅速に混合し、所望であれば得られた溶液のpHを約6.6～約7.8に調整し、得られた溶液(「成形用混合物」)を適切な型または成形デバイスに移し、好ましくは約35℃～約40℃でインキュベートすることを含んでいる。成形用混合物の成分を合せると同時にpHを調整すると最も好都合である。しかし、成形用混合物を適切に硬化させるための型に移すのが最後になるようにする限り、これらのステップを任意の順序で行うことができる。溶液を加温し、pHを挙げる結果、成形用混合物からコラーゲン原繊維が沈殿し、トロンビンの触媒作用によりフィブリノーゲンがフィブリンを形成し、カルシウムイオンの存在下でフィブリンが凝固し、そしてフィブリンの凝固物とコラーゲンのゲルが絡み合って、フィブ

リンを含み収縮物質で収縮させられた水和コラーゲン格子を形成する。

本発明の組織相当物は、水和コラーゲン格子の形成中及び／又は後に更にフィブリンを取り込ませるか又は添加すること以外は従来の特許に記載されているように製造する。

本発明の組織相当物の製造に使用する材料はコラーゲン：フィブリノーゲン：フィリノーゲンからフィブリンを形成させる物質、例えばトロンビン：フィブリノーゲンとコラーゲンを架橋結合させる物質、例えば第XII因子；1種以上の収縮物質：生細胞；栄養培地；及び添加物質を含んでよい。

本発明の組織相当物の形成中にフィブリンを取り込ませる好適な方法は、pH約3～約4、好まし

リンを含み収縮物質で収縮させられた水和コラーゲン格子を形成する。

成形用混合物中に適切な濃度のフィブリノーゲン及びコラーゲンを使用すると、得られるフィブリン-コラーゲン格子はフィブリンのかたまり又はコラーゲンのみから製造した格子よりも強く丈夫である。成形用混合物中のコラーゲン及びフィブリノーゲン濃度はコラーゲン約0.3～約3.0 mg/ml及びフィブリノーゲン約0.3～約3.0 mg/mlであるのが望ましい。コラーゲンが約1.0～約1.5 mg/ml、フィブリノーゲンが約1.5～約2.5 mg/mlの濃度であると特に好ましい。

本発明のフィブリン-コラーゲン組織相当物中のコラーゲンとフィブリンの最終濃度は成形用混合物中のものより約10倍高い。本発明の組織相当物中のフィブリン及びコラーゲンはそれぞれ約3～約30 mg/mlの濃度である。より好ましくは、フ

フィブリンが約15～約25mg/㎠、コラーゲンが約10～約15mg/㎠の濃度である。

フィブリン・コラーゲン格子を収縮させるためには、コラーゲン格子を収縮させるために従来の特許に記載されているものより高い密度の収縮物質がしばしば必要となる。例えば、500,000細胞/㎠で懸濁した繊維芽細胞を使って作製したコラーゲン格子は、1.8mg/㎠のフィブリノーゲン及び2,000,000細胞/㎠の繊維芽細胞を使って作製したフィブリン・コラーゲン格子と同じ割合で収縮した(第1図)。

コラーゲン格子とフィブリン格子を一括に成形して本発明のフィブリン・コラーゲン組織相当物を製造するのが通常好ましいが、コラーゲン格子の表面にフィブリノーゲン及びトロロンピンを適用することにより、格子形成後にフィブリンをコラーゲン格子に取り込ませることもできる。本発明

質として知られている。トロロンピンの存在下でフィブリノーゲンからフィブリンを形成するためにはカルシウムイオンが必要であり、これは栄養培地中に供給すると便利である。しかしながら、所望に応じて、別の方法でカルシウムイオンを成形用混合物に供給することもできる。成形用混合物中のトロロンピンの好適濃度は、約0.1～約10.0単位/㎠である。形成したコラーゲン又はフィブリン・コラーゲン格子の表面にトロロンピンを適用するときには約25単位/㎠の濃いトロロンピン溶液を使用するのが好ましい。

本発明の組織相当物の強度及び安定性は、所望であれば、フィブリンとコラーゲンを架橋結合させる第XII因子(フィブリン安定化因子)のような物質を用いることによりさらに強化することができる。第XII因子は所望の程度の架橋結合が得られる量、例えば0.1～約5単位/㎠使用する。フ

の1つの実施態様では、従来の特許に記載されているように組織相当物を形成し、次いでフィブリノーゲン溶液を適用してコラーゲン格子内に拡散させ、フィブリノーゲンがコラーゲン格子内に拡散した後、適宜第XII因子を含有するトロロンピン溶液を格子に適用する。上記のようにフィブリノーゲンとトロロンピンを順次適用するのが最も好都合であるが、必ずしもそうしなければならないわけではない。形成したコラーゲン又はフィブリン・コラーゲン格子の表面にフィブリノーゲン及びトロロンピンを適用する場合、フィブリノーゲンとトロロンピンの好ましい濃度はそれぞれ約10～約50mg/㎠及び約10～約500単位/㎠である。

フィブリノーゲンからフィブリンを形成させ、成形用混合物の他の成分と相溶性のものであればどのような物質も本発明の実施に使用しうる。現在の所、当業界でトロロンピンのみがこのような物

フィブリンとコラーゲンを架橋結合させるか又はフィブリン・コラーゲン格子を化学的に安定化しうる他の物質も使用できる。場合によっては、フィブリン・コラーゲン格子が蛋白質分解による分解を受けにくくするために、本発明の組織相当物に1種以上のプロテアーゼ阻害剤を加えることが望ましい。

コラーゲン格子を連続的な層に成形して多層の組織相当物を形成することができる。米国特許第4,539,716号及び第4,546,500号明細書参照。上記のようにコラーゲン格子中にフィブリンを取り込ませることにより、このような組織相当物の層の接合が改善されることが発見された。更に、多層の組織相当物を形成するために接合させる形成されたコラーゲン又はフィブリン・コラーゲン格子の層の一方又は両方の表面にフィブリノーゲン及びトロロンピンを適用することにより、多層のコ

ラーゲン又はフィブリン-コラーゲン組織相当物の層間の接着を改善することができる。

本発明の組織相当物は血清を含まない培地及び血清を含有する培地の両方で製造できる。血清を含まない培地中で製造すると、より経済的であり、また血漿中に通常存在する固定されていない因子の存在が除去されるので、工程のコントロールがより良好なものとなる。

次の実施例を参考に本発明を更に説明するが、実施例は全く純粋に例示のためのものであり、本発明の範囲を限定するために使用することを意図するものではない。

次の実施例に使用する材料は実施例中に示した入手源から得たもの又は示した出版物に従って調製したものである。

ベトリ皿に注ぎ入れ、37℃で、湿気のある5% CO<sub>2</sub> - 95% 空気雰囲気中でインキュベートした。翌日以降、フィブリン-コラーゲン格子の直径を測定し、その結果を第1図に示した。フィブリン-コラーゲン濃度が上昇するにつれ、格子の収縮にはより多くの細胞を必要とした。2つの最高濃度のフィブリン-コラーゲンを使用して製造した格子は、コラーゲンのみ又は主としてコラーゲンが細胞外マトリックス成分である格子よりもより不透明であり、ゼラチン様触感がより少なかった。使用したフィブリン-コラーゲン調製物の60%が凝固しうる蛋白質であり、その約2/3が溶液に移行するだけなので、成形用混合物中の実際のフィブリン-コラーゲン濃度はそれぞれ約1.8、0.6、0.2、0.06及び0.02mg/mlであった。

フィブリン-コラーゲン及びフィブリンに関する以外の試薬と手順についての一般的な記載は従来の特

## 実施例 1

### フィブリン-コラーゲンを使用した組織相当物の成形物の製造

フィブリン-コラーゲン (Hiles laboratories) を1.76倍に濃縮したMcCoy's 5A培養培地に溶解し、10、3、1、0.3及び0.1 mg/mlの名目濃度とした。濃縮培地 2.3ml、ウシ胎児血清 (FBS) 0.45ml、0.1N NaOH 0.25ml、0.1% 酢酸中 3 mg/ml で溶解したラットの尾の腱のコラーゲン 1.5ml、及び10% FBSとトロンビン (Sigma Chemical社) 5単位を補ったMcCoy's 5Aに懸濁した繊維芽細胞 0.5mlを一緒に混合することによりフィブリン-コラーゲン格子を製造した。繊維芽細胞は500,000細胞/ml又は2,000,000細胞/mlの密度で使用した。フィブリン-コラーゲンを添加していない培地を使用し、上記と同様に対照の格子を製造した。

得られた混合物を個々の60mmのプラスチックの

許にも記載されている。

## 実施例 2

### コラーゲン格子成形後に該コラーゲン格子にフィブリンを取り込ませることによる組織相当物の製造

フィブリン-コラーゲン又はトロンビンは全く使用せずに実施例1と同様にして2種のコラーゲン格子を製造し、数日間収縮させた。血清を含まない培地で数回すすぎ、血清を除去し、次に過剰の培地を吸引した。フィブリン-コラーゲンの濃い水溶液 (25 mg/ml) の滴を各格子表面上に置き、格子内に拡散させた。トロンビン (500U/ml) 及びフィブリン安定化因子 (第XIIa因子、10U/ml、Calbiochem) の滴を1つの格子に置き、次に第二の格子を第一の格子上に置いて約1分間緩やかな圧力下に維持した。血清を含む培地を加えて格子を覆った。1時間後に、各格子をピンセットではさんだが、引離

すことは出来なかった。結合が十分強かったので、離れる前に格子自体が裂けた。同様に処理したが、フィブリノーゲンを添加しなかった対照の格子は別々に浮遊していた。このように、成形し収縮させた後に格子に加えたフィブリノーゲンは格子を接着させるために使用できる。またこの方法は、組織相当物の端を接着させたり、組織相当物の裂け目又は切れ目を修復するのに使用される。

### 実施例 3

#### フィブリノーゲンを使用した血管組織相当物の成形物の製造

6 mm の心棒を有するヘパリンを加えた25 mm のシリンドー内で、名目濃度 0、5.5又は11 mg/ml のフィブリノーゲンを含む1.76倍のMcCoy's 5A培地13.8 ml、ラットの尾の腱のコラーゲン(0.1% 酢酸中 3.3 mg/ml) 9.0 ml、FBS 2.7 ml (少なくとも1 U/ml のトロンビンに等しい凝固剤活性を選

ーゲン(成形用混合物中の実濃度は約1 mg/ml)を使って製造した血管組織相当物の破裂強度は135~150 mm Hgであった。血管組織相当物を手術用のはさみで切開すると、層はピンセットで引張って容易に離れ、分離することができた。

凝固培地中の名目濃度11 mg/ml のフィブリノーゲン(最終的な成形用混合物中約 2.0 mg/ml)を使って製造した血管組織相当物の破裂強度は165~180 mm Hgであった。これ等は圧力テストの間に層に剥離せず、また横に切っても斜めに切っても剥離しなかった。切断した片は層分離することなく結合することができた。このテストには6-0ポリプロピレン縫合糸(Davis & Geck)と先端の針を使用した。

このように、フィブリン-コラーゲン格子を使用して製造した血管組織相当物の層は、従来の特許に従ってコラーゲン格子で製造した血管組織相

当物(0.1N NaOH 1.5 ml及び10% FBSを補ったMcCoy's 5A培地中の平滑筋の懸濁液 3.0 mlから血管組織相当物を成形した。平滑筋細胞は500,000細胞/ml又は2,000,000細胞/mlの密度で使用した。心棒の周りに平滑筋層を収縮させた後、Dacron<sup>R</sup>メッシュを第一の層上にそっと置き、平滑筋ではなく外膜の繊維芽細胞を使ってその周りに第二層を成形した。第二層成形の2週間後に、心棒から血管組織相当物を取りはずし、Science 231: 397~400 (1986)に記載されているように破裂強度を測定した。

従来の特許に従って、フィブリノーゲンを使用せずに製造した血管組織相当物の破裂強度は100~120 mm Hgであった。破裂強度テストの間に、内層(平滑筋)と外層(外膜繊維芽細胞)とが分離した。

凝固培地中の名目濃度 5.5 mg/ml のフィブリノ

当物より破裂強度が強いばかりでなく、慣用の外科手法による扱いを非常に容易にするものである。

### 実施例 4

#### 血清を含まない培地中でのフィブリノーゲンを使用した血管組織相当物の製造

6 mm の心棒を持つヘパリンを添加したガラスのシリンドー(直径25 mm)中で血管組織相当物を成形した。5 cmの長さの血管組織相当物を作るために、20 mlの最終的な成形用液を使用した。

(名目上)10.2 mg/mlの濃度で牛のフィブリノーゲン(Miles Laboratories)をグルコース濃度の高い1.7倍濃縮のDMEM: Ham's F12 培地(HA Bioproducts)に溶解した。これに、グルタミン(HA Bioproducts)、ゲンタマイシン(HA Bioproducts)、重炭酸ナトリウム及び11%(容量)の0.05N水酸化ナトリウムを補った。成形容部の51%に十分な量を製造した。

0.05% 酢酸に3mg/㎖溶解した(豚皮からの) I 型コラーゲンにこの混合物を加えた。コラーゲン溶液の容積は最終容積の30%であった。

1 箱の DHEM: Ham's F12 中に 1.5~2.0 細胞/㎖で懸濁させた平滑筋細胞を最終容積の10%まで加えた。

インシュリン、トランスフェリン、セレン、トリヨードチロニン、ステロイド類、エタノールアミン及びo-ホスホリルエタノールアミン、トロンビン、並びに表皮成長因子を含有する増殖補充剤 (Scott Laboratories 及び Sigma Chemical 社) を最終容積の 9% の容積加えた。

この混合物を誘型に注ぎ入れ、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下37℃でインキュベートした。

1 週間後にメッシュを置いた。

平滑筋細胞ではなく外膜繊維芽細胞を使用すること以外は上記と同様にして第2層を適用した。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は種々のフィブリンノーゲン及び繊維芽細胞濃度を有するフィブリン・コラーゲン格子の収縮を示すデータをプロットしたグラフである。

更に1週間後に、心臓からはずし、中膜層と外膜層の間の接着を立証するために手術用のはさみで切った。コラーゲン格子で作った対照の血管組織相当物の中膜層と外膜層は、フィブリン・コラーゲン格子で作った血管組織相当物よりも切断の際に分離しやすい傾向にあった。このように、フィブリン・コラーゲン格子は血漿を含まない培地中で製造でき、やはりコラーゲンのみで製造したものより改善された接着性及び操作特性を提供する。

本明細書中の実施例及び実施態様は単に説明の目的のみのものであり、それ等に基づいて当業者に示唆されるであろう種々の改変及び変更は本出願及び承認された特許請求の範囲の趣旨及び範囲に包含されるものであると理解されなければならない。

出願人 オーガンジェネシス・インコーポレイテッド  
代理人 弁護士 川 口 義 雄  
代理人 弁護士 中 村 至  
代理人 弁護士 船 山 武

第 1 図

フィブリン-コラーゲン格子の収縮

